PRÁCTICA 5: ENZIMAS

DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD CATALÍTICA DE LA ENZIMA AMILASA

II Semestre, 2025

TEC | Tecnológico de Costa Rica

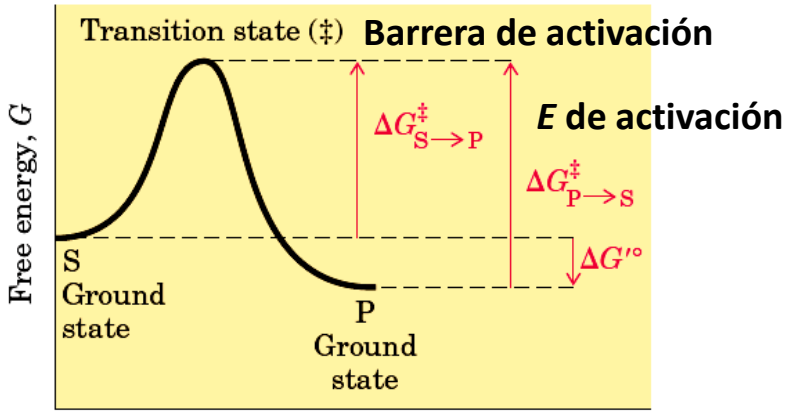
Enzimas

Proteínas catalizadoras

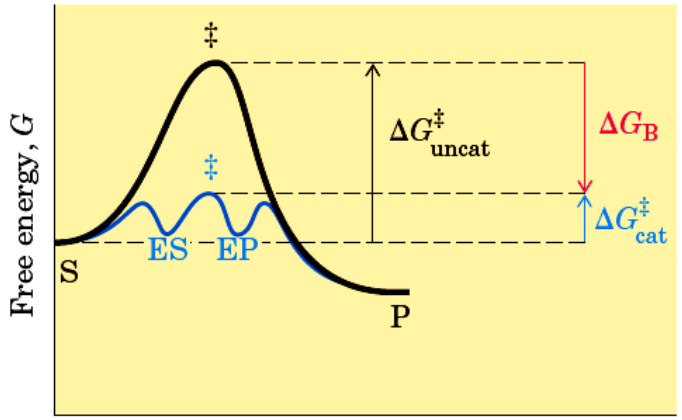
Regulan la rapidez de las reacciones químicas ligadas a los procesos biológicos fundamentales para los procesos vitales, pero ellas mismas no se ven afectadas en el proceso

Actividad Enzimática → **"Cantidad de producto formado o cantidad de sustrato degradado por unidad de tiempo"**

$$E + S \rightleftharpoons ES \rightleftharpoons EP \rightleftharpoons E + P$$



Reacción química no catalizada



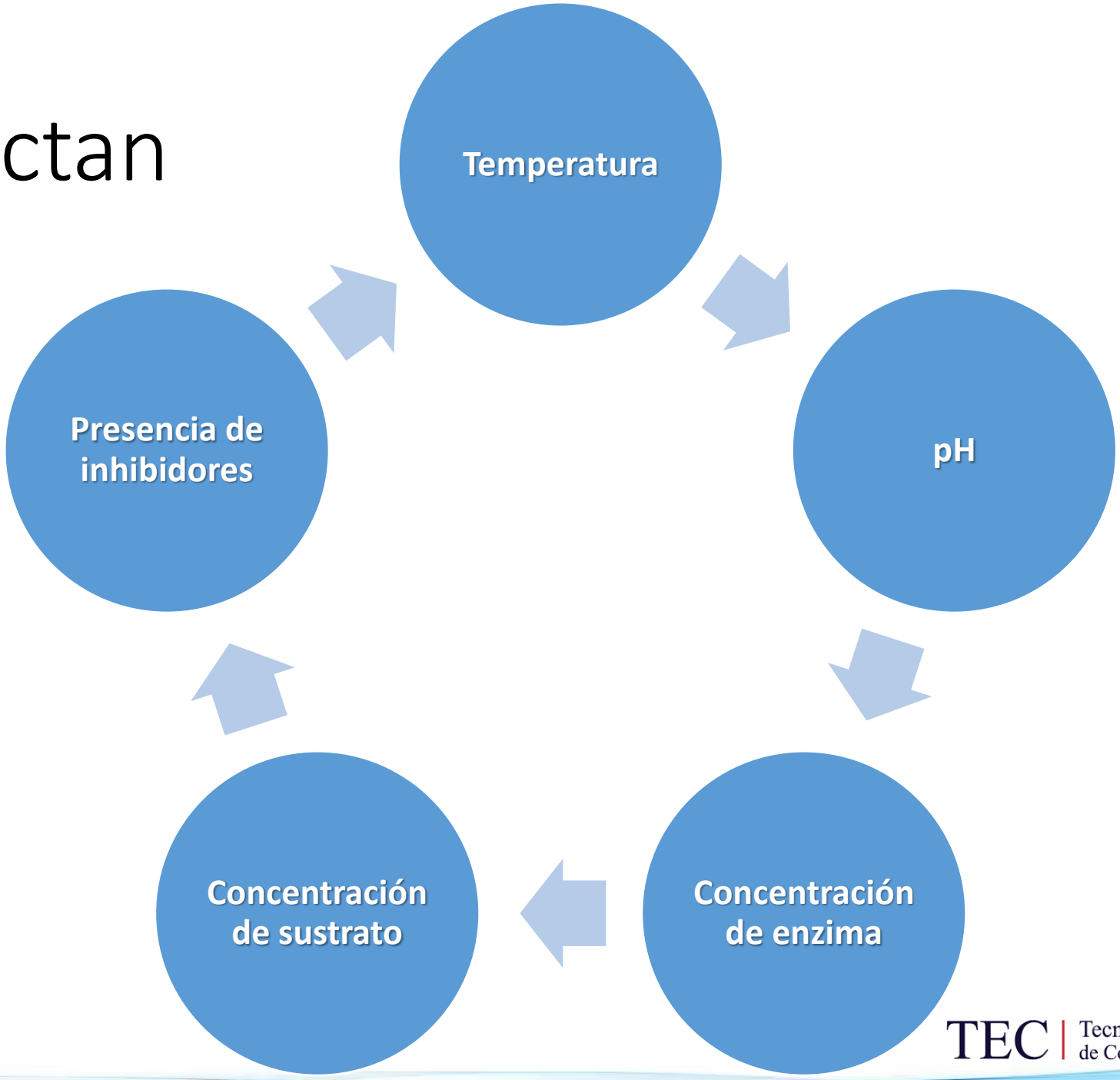
Reacción química catalizada

La unión de la enzima al estado de transición es exergónico, por lo que la E liberada de esta unión reduce el ΔG++

Factores que afectan la velocidad de reacción

Las enzimas no alteran las constantes de equilibrio (K*eq*):

La K*eq* de una reacción es la misma independientemente que se alcance el equilibrio con catálisis enzimática



Enzimas

Moléculas catalizadoras

Cada enzima cataliza una rxn específica

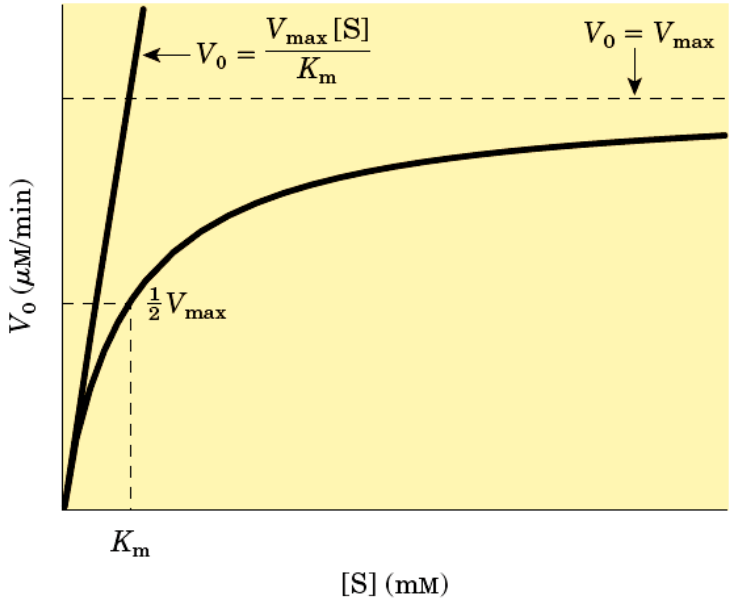
Cada reacción en la célula es catalizada por una enzima diferente

Actividad Enzimática

Depende de:

- **Temperatura**
- **pH**
- **Concentración enzima**
- **Concentración sustrato**
- **Tiempo de reacción**
- **Presencia de inhibidores**
- **Modificaciones alostéricas**
- **Modificaciones covalentes**

Efecto de la concentración de la enzima y del sustrato en la actividad enzimática



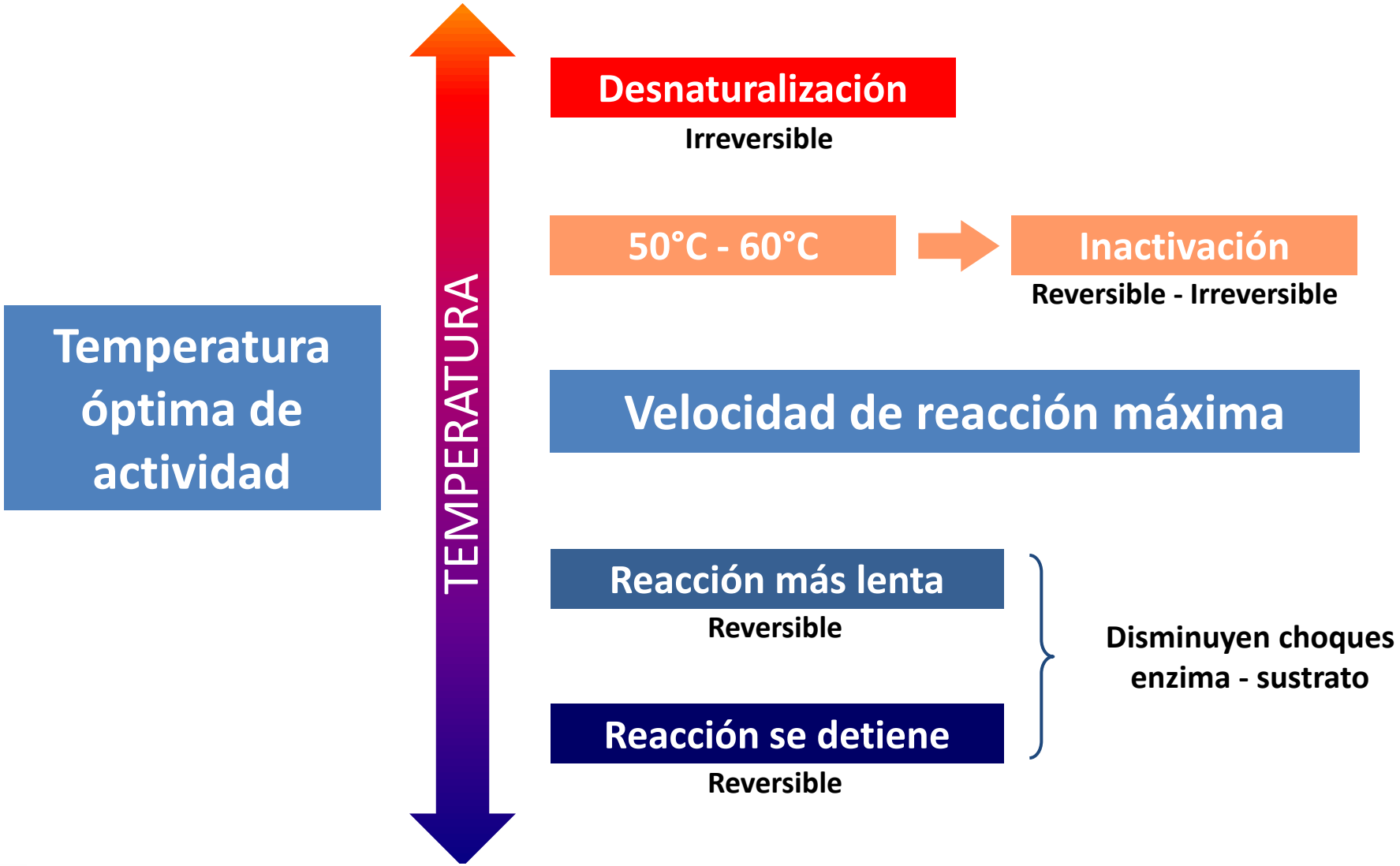
$$V_0 = \frac{V_{max}[S]}{K_m + [S]}$$

Ecuación de Michaelis-Menten

Si una reacción ocurre a una temperatura y pH constantes y hay un exceso de sustrato, la velocidad de reacción es directamente proporcional a la cantidad de enzima presente

A una reacción a la que se añade una concentración de enzima definida, con las demás condiciones físicas constantes, tendrá una velocidad de reacción proporcional a la cantidad de sustrato, hasta un valor límite

Efecto de la temperatura en la actividad enzimática



Definiciones de actividad enzimática

Unidad enzimática	• (U): cantidad de enzima que cataliza la conversión de 1 μmol de sustrato en un minuto
U/ml	• Unidades por ml disolución
U/mg prot	• Número de unidades de enzima por miligramo proteína
katal	• Unidad de actividad enzimática: cantidad de enzima que transforma 1 mol de sustrato por segundo: (kat)

Guide to Enzyme Unit Definitions and Assay Design | Biomol Blog | Resources | Biomol GmbH - Life Science Shop

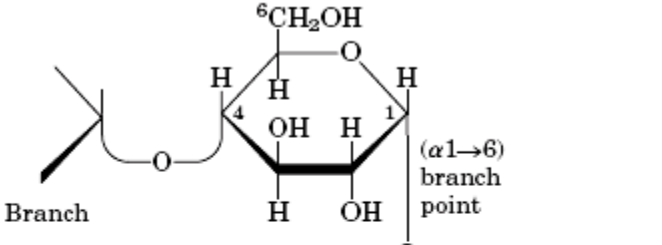
Prueba de Yodo

Diferenciar polisacáridos lineales y ramificados

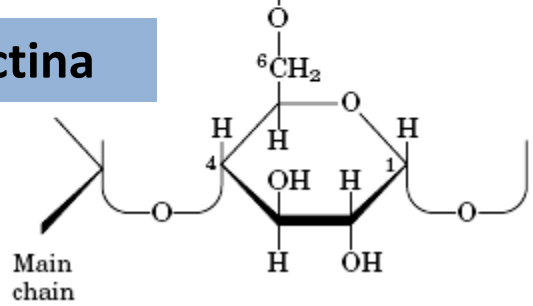
Yodo

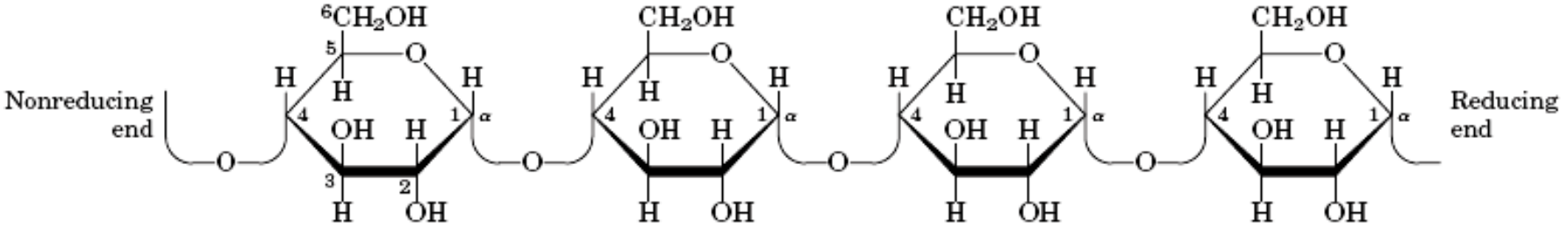
Forma un complejo coloreado con los polisacáridos por adsorción a sus cadenas

Almidón = Amilosa + Amilopectina



Amilopectina



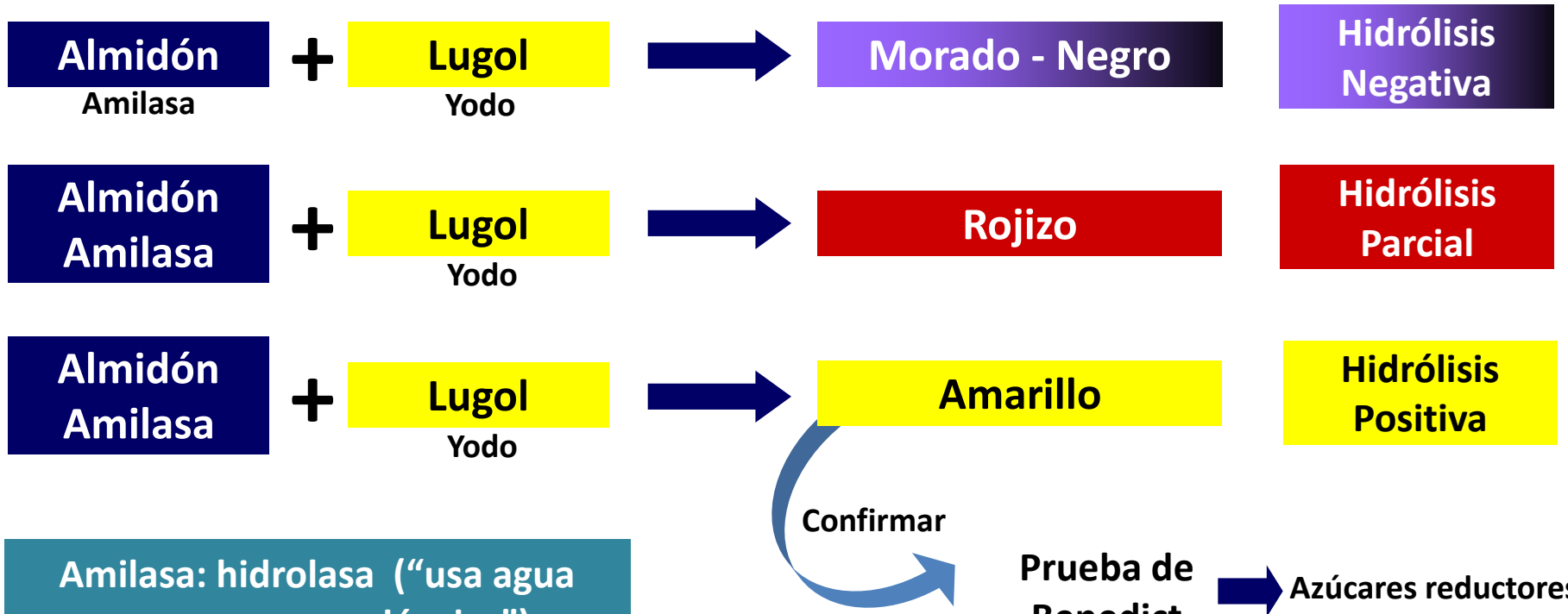


Amilosa

Determinación de la actividad catalítica

Se utilizan concentraciones crecientes de la enzima o del sustrato

Para determinar si la reacción ocurrió se requiere de un sistema que indique la aparición del producto o el consumo del sustrato



Amilasa: hidrolasa ("usa agua para romper moléculas")

Reacción de Benedict

Azúcares reductores

Benedict

Sulfato de cobre
Citrato de sodio
Carbonato de sodio
NaOH

→ **Azúcares reductores**

- **Monosacáridos** → Glucosa
- **Algunos disacáridos** → Maltosa, Lactosa
- **OH libre**

Cu^{2+} (Azul) —Reducción→ Cu^{+} —+ NaOH, Precipita→ Cu_2O (Rojo - Amarillo)

Verde – Amarillo → **Poco azúcar reductor**

Ámbar– Naranja → **Más 1,5% azúcar reductor**

ACTIVIDAD ENZIMÁTICA A DIFERENTES CONCENTRACIONES DE AMILASA

Volúmenes en ml

Reactivo	A	B	C	D	E	F
Solución de almidón 1% a 37°	5	5	5	5	5	5
Solución salina 0,85%	1	0,9	0,8	0,5	0	0
Enzima α-amilasa*	0	0,1	0,2	0,5	1	0
Saliva	0	0	0	0	0	1**

Realizar la incubación a 37°C

ACTIVIDAD ENZIMÁTICA A DIFERENTES CONCENTRACIONES DE AMILASA

3. Agitar los tubos hasta homogenizar la mezcla de almidón y amilasa.

4. Incubar por 5 minutos a 37°C contando el tiempo a partir del momento en que se acaba la agitación luego de añadir la enzima.

5. Después del tiempo de incubación, añadir a cada tubo 1 ml de lugol y observar si aparece color o no.

6. Anotar cual fue el tubo con menor cantidad de enzima y digestión total de almidón.

7. Interpretar según las siguientes instrucciones
.

HIDRÓLISIS NEGATIVA: Color azul, lila o negro (no se hidrolizó el almidón)

- HIDRÓLISIS PARCIAL: Color rojizo (se hidrolizó parte del almidón)

- HIDRÓLISIS POSITIVA: Color amarillo del lugol (se hidrolizó todo el almidón)

Actividad enzimática con diferentes tiempos de reacción

1. Preparar 6 tubos con 0,1 ml de lugol en cada uno y otros 2 tubos con 3 ml de reactivo de Benedict
2. En un tubo aparte, pipetear 10 ml de almidón e incubarlo por al menos 5 min a 37°C para que tenga esa temperatura al momento de iniciar el montaje
3. Se le agrega el doble de la cantidad de amilasa que se le añadió al tubo que, en el procedimiento anterior, tenía la menor cantidad de enzima y digestión total de almidón
4. Mezclar lo más rápido posible

Actividad enzimática con diferentes tiempos de reacción

5. Pipetear 1 ml de la dilución de almidón en uno de los tubos con Lugol y 1 ml en un tubo con reactivo de Benedict
6. En intervalos de un minuto, pipetear 1 ml de mezcla (almidón+amilasa) en los restantes tubos con Lugol
7. Después de 5 minutos pipetear 1 ml de la mezcla (almidón+amilasa) en el segundo tubo con reactivo de Benedict
8. Calentar a ebullición los dos tubos con mezcla (almidón+amilasa) y reactivo de Benedict
9. Anotar las variaciones de color en los diferentes tubos con lugol y reactivo de Benedict

Recordatorio:

- El examen este **lunes 22** de setiembre a las **3:00pm**
- El aula se informa por medio de la plataforma del **TEC-Digital del curso de teoría**
- Se evaluarán las prácticas 1 a 4, las instrucciones de seguridad y la práctica asincrónica de actividad antioxidante